

200906016B

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

心筋組織再生を物理的・機能的に促進する

新規再生治療用デバイスの開発

平成20-21年度

総合研究報告書

研究代表者 齋藤 充弘

平成22(2010年)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
心筋組織再生を物理的・機能的に促進する新規再生治療用デバイスの開発
平成20-21年度
総合研究報告書

研究代表者 齋藤 充弘
平成22(2010年)年 3月

目 次

総合研究報告書

A. 研究目的	2
B. 研究方法	4
C. 実験結果	6
D. 考察	7
E. 結論	8
F. 健康危惧情報	9
G. 研究発表	9
H. 知的財産の出願・登録状況	10

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助（再生医療実用化研究事業）

総合研究報告書

心筋組織再生を物理的・機能的に促進する新規再生治療用デバイスの開発

研究代表者

齋藤 充弘 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 助教

研究要旨 エラスチンに代表される弾性繊維の発現を制御する因子と、心筋の再生を誘導する因子を固定もしくは徐放するマトリックスを構築し、不全心に移植することで、心臓の弾性を回復させ、さらに心筋組織を再生させる、新規な心筋再生用デバイスを開発する。そのため、まずエラスチン誘導因子と心筋再生因子の選択、マトリックスとの組み合わせの検討、そして、その安全性および有効性について心不全モデル動物にて検証を行った。さらに、選択した心筋再生因子の発現を誘導する低分子化合物を主体とする候補因子を選び出し、その安全性および有効性について心不全モデル動物にて検証を行い、心筋再生誘導を賦活化する低分子化合物を明らかにした。以上の結果から、心筋組織の修復を物理的、機能的に促す因子の選択とそれら因子を保持するマトリックスの基本デザインを決定し、これらの組み合わせを検討することで、目的の新規デバイスの開発が可能となることが示唆された。

A. 研究目的

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後、心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者はその耐久性や合併症など、後者はドナーの確保や免疫抑制剤の使用等に問題があり、普遍的な治療とは言い難いのが現状である。最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。

近年、重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている(Hagege AA, et al. *Circulation* 114:1108-113, 2006)。我々も、自己骨格筋芽細胞と骨髄単核球細胞移植を併用すると、単独より心機能改善効果が高いことを証明し

(Memon IA, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130(3):646-653, 2005)、大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおいて臨床研究をすすめている。さらに、自己筋芽細胞を細胞シート工学の手法により組織化し、これを虚血性心筋症モデル動物や拡張型心筋症モデル動物に移植することにより著明な組織の改善と心機能の向上が起ることを示した(Miyagawa S, et al. *Transplantation* 80:1586-1595, 2005, Memon IA, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1333-1341, 2005, Kondoh H, et al. *Cardiovasc Res* 69(2):466-475, 2006)。しかし、この手法では、細胞シートグラフトを作製するために自己筋芽細胞を長期間培養する必要があり、緊急性の高い治療を必要とする重症患者への対処が困難である。

一方、最近の組織幹細胞研究の進歩により、心臓においても、細胞分裂し心筋細胞に分化しうる心筋幹細胞の存在が発見された(Beltrami AP, et al. *Cell* 19:763-776, 2003, Oh H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12313-12318, 2003, Laugwitz KL, et al. *Nature* 433(7026):647-653, 2005)。よって、従来では胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞といった多分化能をもった細胞が

らしか再生しえないと考えられていた心筋細胞が、自己心筋組織に存在する心筋幹細胞によって再生しうる可能性が示唆された。

また、近年のナノバイオテクノロジーの発展により、材料の表面の微細構造や、幹細胞の分化誘導を制御するケモカインやそのレセプター、その他分化誘導因子などを、ナノレベルで制御することにより機能性材料を構築し、それによって幹細胞の分化や機能を自在に操作する技術(セルマニピュレーション)が可能になり、革新的材料開発も新しい段階を迎えたと言える。

これまでも、コラーゲンなどの生体吸収性材料からなる 3 次元の担体に細胞を播種し心筋組織を再生させる研究は報告されている(Li RK, et al. *Circulation* 100:II63-69, 1999)。しかし、心筋幹細胞を病巣に誘導し、かつ増殖、分化を制御して材料自身の機能によって心筋を再生するようなデバイスは現在のところ存在しない。

さらに、エラスチンに代表される弾性繊維の発現を制御する因子を組み合わせ、固定もしくは徐放するマトリックスを構築し、不全心に移植することで、心臓の弾性を回復させ、さらに心筋組織を再生させる、新規な心筋再生用デバイスの開発が可能となる。

本研究では、エラスチンに代表される弾性繊維の発現を制御する因子と、心筋の再生を誘導する因子を固定もしくは徐放するマトリックスを構築し、不全心に移植することで、心臓の弾性を回復させ、さらに心筋組織を再生させる、新規な心筋再生用デバイスを開発する。そのため、エラスチン誘導因子と心筋再生因子の選択、マトリックスとの組み合わせの検討、そして、その安全性および有効性について重症心不全モデル動物にて検証を行った。

さらに、各因子について臨床応用可能な因子を選択するために、心筋再生因子を生体内で誘導する低分子化合物を主体とした因子について検討を行った。

さらに、再生医療用の新規なマトリックスとして、終末糖化産物(Advanced glycation end products ; AGEs)を応用した。AGEs は、タンパク質と糖類が非酵素的に反応したもので、生体内においては高血糖状態の血液中などで産生される。近年、AGEs が血管内皮細胞の VEGF 産生を促進し、*in vivo* において血管新生を誘導することが報告されている。本研究では、糖化架橋したアルブミンを新規に合成し、その血管新生誘導効果について

検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 心筋再生誘導因子とエラスチン 産生促進因子の選択

B-1-1. 心筋梗塞モデルラットに対す る筋芽細胞シート移植の心機能改善 効果メカニズムの検討

8週令のLewisラットを用い、全身麻酔下にて開胸後、心臓を露出し、左前下行枝を結索し、心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞の確認は、肉眼的、心臓超音波にて行った。予め、同種ラットの両前脛骨から骨格筋を採取し、骨格筋筋芽細胞を単離、培養し、梗塞後2週間のモデルラットの心臓に直接、温度応答性培養皿上で作製した筋芽細胞シートを移植後した。継時的に心臓超音波検査にて心機能を測定し、移植後1, 4, 8週後に組織を採取し、その組織の遺伝子発現をAffymetrix Gene Chipで解析した。

B-1-2. エラスチン産生促進因子の選 択

エラスチン産生促進因子について
は、エラスチン関連蛋白に由来し、線

維芽細胞等にエラスチン産生を促進
する候補因子を選択した。

B-2. 各因子の *in vitro* における効果 の検討

心筋梗塞モデルラットの梗塞部位
の組織を細切し、培養皿に接着させ培
養した。接着組織から増殖した細胞を
ラット心臓由来線維芽細胞として継
代培養を行った。

選択したエラスチン産生促進因子
について、ラット心臓由来線維芽細胞
の培養上清に添加し遺伝子発現の変
化をRT-PCRにて評価した。

B-3. 心筋再生誘導因子を誘導する因 子の選択

B-1. で絞り込んだ3つの有力候補
因子を、生体内での産生を誘導する低
分子薬剤を候補因子として選択した。

B-4. 候補低分子化合物の *in vitro* に おける効果の検討

B-4-1. 血管誘導促進効果の検討

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞
(HUVEC) と正常ヒト皮膚線維芽細
胞(HDFB)の共培養下にて評価した。

候補因子は2日ごとの培地交換時に添加し、培養10日後に抗CD31抗体により管腔の染色を行い、顕微鏡下で計測した。

B-4-2. 心筋再生誘導因子産生の検討

HUVEC と HDFB の共培養下に、もしくは HDF 単独培養下で培養液に候補因子を添加後、経時的に培養上清をサンプリングし、培養上清中の HGF, VEGF 濃度を ELISA キットにて測定した。さらに HGF, VEGF の遺伝子発現を解析した。

B-5. 各因子を導入するマトリックスの作製

B-5-1. 糖化架橋アルブミンの作製

EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)存在下で架橋したウシ血清アルブミン(BSA)に、最終濃度 0.5 M となるようにリボースを添加し、37°C 3 日間保持することで非酵素的に糖化反応を行った。未反応物を透析で除去した。リボースを添加せず 37°C 3 日間保持した架橋アルブミンを比較対象とした。

B-5-2. ヒト臍帯静脈由来内皮細胞

(HUVEC) の増殖促進効果

HUVEC の培養上清に、各種濃度のリボース化アルブミンを添加し培養した。1週間後、細胞増殖を MTT 法を用いて評価した。

B-5-3. ラット虚血モデルによる血管新生効果の検討

ラット下肢虚血モデルは左総腸骨動脈を結紮し作製した。下肢血流量と組織学的評価により血管新生効果を検討した。さらに、ラット心筋梗塞モデルは左前下降枝を結紮し作製した。組織学的評価と超音波測定により心機能を評価した。

B-6. 候補低分子化合物の in vivo における効果の検討

ビーグル種成犬にペースメーカーを植え込み、230回/分で持続的に高速ペーシングを行って拡張型心筋症モデルを作製した。ペーシング開始4週後に候補因子を左心室心筋内に直接注入した群、もしくは sham operation(C 群)を施行した。移植前後で経時的に経胸壁心エコーを用いて心機能を評価し、術後4週で心筋組織を採取し組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。

C. 研究結果

C-1. 心筋再生誘導因子とエラスチン産生促進因子の選択

現在、我々が行っている、心筋梗塞部位への筋芽細胞シート移植によって心機能の回復が認められた心筋組織について、遺伝子発現パターン of 遺伝子チップ解析結果と、再生心筋組織の免疫染色結果から、心筋組織再生時に高発現する因子の抽出を行い、HGF, VEGF, SDF-1 の3つの有力候補因子に絞り込んだ。

C-2. 各因子の *in vitro* における効果の検討

候補因子として選択したエラスチ

ン産生促進因子は、ラット心筋由来線維芽細胞に対して、エラスチン遺伝子の発現を増強することが明らかとなった。以上の結果から、本因子がエラスチン促進因子として有用であることが示された。

C-3. 候補低分子化合物の選択

心筋組織再生時に高発現する因子として抽出した、HGF, VEGF, SDF-1 の3つの成長因子について、これらの発現と産生を誘導する可能性の高い因子を心筋再生誘導因子の候補因子として選択し、*in vitro* および *in vivo* における、その効果を検証した。

C-4. 候補低分子化合物の *in vitro* における効果の検討

心筋再生誘導の候補因子として選択した因子は、HUVEC と HDFB の共培養下に、HUVEC の管腔形成を促進することが明らかとなった。さらに、同様に共培養下において、HGF, VEGF, EGF, SDF-1 の産生を促進した。

以上の結果から、本因子が心筋再生誘導因子として有用であることが示された。

C-5. 各因子を導入するマトリックスの作製

C-5-1. 糖化架橋アルブミンの作製

架橋アルブミンは、作製条件の違いによって、ゲル状やスポンジ状など異なる形態のものを作製することが可能である。

C-5-2. ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) の増殖促進効果

リボース化架橋アルブミンは *in vitro* において HUVEC の増殖を濃度依存的に増加させた。しかし、高濃度では細胞毒性を示し、細胞増殖が抑制された。

C-5-3. ラット虚血モデルによる血管新生効果の検討

リボース化架橋アルブミン投与群において、ラット下肢虚血部に移植後 4 週間で優位に血流の改善が認められた。さらに、ラット心筋梗塞部位への移植においても心機能の改善と左室の拡大を抑制した。

C-6. 候補低分子化合物の *in vivo* における効果の検討

術後の心エコーでは、術前の状態と比して、因子移植群では有意に左室駆出率(EF)は改善していたが、sham 群

では改善は認められなかった。組織学的検討においては、因子群において、有意な心筋線維化の抑制、心筋内における新生細胞の増加が認められ、リモデリング抑制効果が示された。

以上の結果から、心筋再生誘導因子の候補因子は、左室のリモデリング抑制効果と心機能の改善が認められた。

D. 考察

本研究の最も大きな特色は、心臓の機械的補助をする弾性組織の産生を促進する因子と、心筋再生を誘導する因子を固定、徐放するようなマトリックスを移植することで、自己組織の修復能力を機械的、機能的に制御し、心筋組織を再生することである。つまり、細胞移植や細胞培養など必要とせず、自己体内で自己組織修復能により心筋を再生するデバイスの開発は、末期重症心不全治療における新しい方向性を見出すことである。

まず、各種因子の選択とそれら因子の機能の確認、さらに因子を保持するためのマトリックスの設計と作製を中心に研究開発を進めてきた。特に、新規マトリックスの作製では、アルブミンという生体内に存在するタンパク質をベースに、糖を付加するだけで、

血管新生効果を持たせることを可能にした。この新規マトリックスは、マトリックス自体が血管新生誘導能を保持しているという、極めてユニークな性能を持っており、再生医療用の血管新生材料として有用であることが示唆された。このマトリックスをベースにして、次年度以降は因子の担持方法を最適化し、心臓表面で効果的に徐放させ、組織修復を促進するような条件について検討を行う予定である。

さらに心筋再生を誘導することが明らかとなった、HGF, VEGF, SDF-1などの心筋再生誘導に関連する因子が、タンパク性の因子であるため、薬剤としての安定性、体内半減期、材料と組み合わせた際の加工性が乏しく、デバイス設計にとって障壁となっていた。そこで、本研究では、これらの心筋再生誘導に関連する因子を、生体内で誘導することにより、筋芽細胞シートと同様の心筋再生効果が期待され、本来持つ再生能力を賦活化することで、病態に適した再生を促進できる可能性が示唆される。さらに、本因子は低分子化合物を主体としていることから、徐

放化の制御やマトリックスとの組み合わせ、デバイス設計が、タンパク性の因子と比較して容易になる。

E. 結論

これまでの研究成果より、心筋組織の再生を促進する低分子化合物を主体とした因子を選択した。さらに、エラスチンの産生を促進する候補因子を見出した。また、マトリックス自体が血管新生誘導能を保持しているという、極めてユニークな性能を持った、新規再生医療用マトリックスを開発した。心筋組織の修復を物理的、機能的に促す因子の選択とそれら因子を保持するマトリックスの基本デザインを決定したことから、これらの組み合わせを検討することで、目的の新規デバイスの開発が可能となることが示唆された。

既存の心筋再生治療で問題となっている細胞移植や細胞培養など必要とせず、自己体内で自己組織修復能により心筋を再生するデバイスが具体化し、次いで、さらに安全性と有効性が検証され臨床へ展開されれば、末期重症心不全治療における新しい方向性を見出すことが可能となり、多くの重症心不全患者のQOLを飛躍的に高

めることが期待できる。社会的効果として、心移植でしか救命できない重症心不全患者を救済することが可能となる。加えて、心臓移植と比較して安価な重症心不全患者に対する根治的治療法が可能となり、医療経済へも貢献すると期待される。本研究は、基礎的研究成果の社会還元に向けた一層の加速ならびに国際競争力の強化に資するものである。

F. 健康危惧情報

特記事項なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired Myocardium Regeneration With Skeletal Cell Sheets-A Preclinical Trial for Tissue-Engineered Regeneration Therapy. Transplantation. *in press*

Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T,

Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(4) 985-993 (2009)

Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(2) 460-467 (2009)

Saito A, Takekita K, Miki K, Sawa Y, Crosslinked and glycated albumin such as advanced glycation end products (AGEs) induce angiogenesis in rat ischemic hindlimb. (on contribution)

G-2. 学会発表

宮川繁、松宮護郎、倉谷 徹、坂口太一、山内 孝、上野高義、齋藤充弘、斉藤俊輔、首藤恭広、今西悠基子、澤芳樹「重症不全心再生治療の現状と展望」日本DDS学会 2009年7月

3日

宮川繁、松宮護郎、倉谷 徹、上野高義、坂口太一、山内 孝、齋藤充弘、齋藤俊輔、首藤恭広、上仲永純、今西悠基子、澤 芳樹「虚血性心筋症に対する細胞を用いた再生型治療の現状と展望」日本冠動脈外科学会 学術大会 2009年7月16日

齋藤 充弘 「細胞シートによる心筋再生治療の現状と展望」細胞シート2009 公開シンポジウム 2009年10月29日

宮川繁、松宮護郎、坂口太一、山内 孝、齋藤充弘、齋藤俊輔、首藤恭広、今西悠基子、倉谷 徹、上野高義、清水達也、岡野光夫、澤 芳樹「重症心不全に対する自己細胞組織移植と左室補助人工心臓を用いた集学的心筋再生治療」日本人工臓器学会大会 2009年11月13日

齋藤 充弘、宮川 繁、澤 芳樹「細胞シートによる心筋再生治療の現状と展望」第3回 Smart Biomaterials セミナー 2010年1月15日

齋藤 充弘、清水 達也、岡野 光夫、

澤 芳樹「重症心不全に対する自己細胞治療の現状と展望」第56回日本心臓病学会学術集会 2008年9月10日

齋藤 充弘、三木健嗣、荏原充宏、嶽北和宏、内村英一郎、澤 芳樹「アルブミンを用いた新規再生医療用血管新生誘導材料の開発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008年11月17-18日

齋藤 充弘、清水 達也、岡野 光夫、澤 芳樹「心筋再生医療の現状と展望」第5回ナノバイオ国際シンポジウム 2009年2月19日

H. 知的財産の出願・登録状況

H-1. 特許取得

特記事項なし。

H-2. 実用新案登録

特記事項なし。

H-3. その他

特記事項なし。

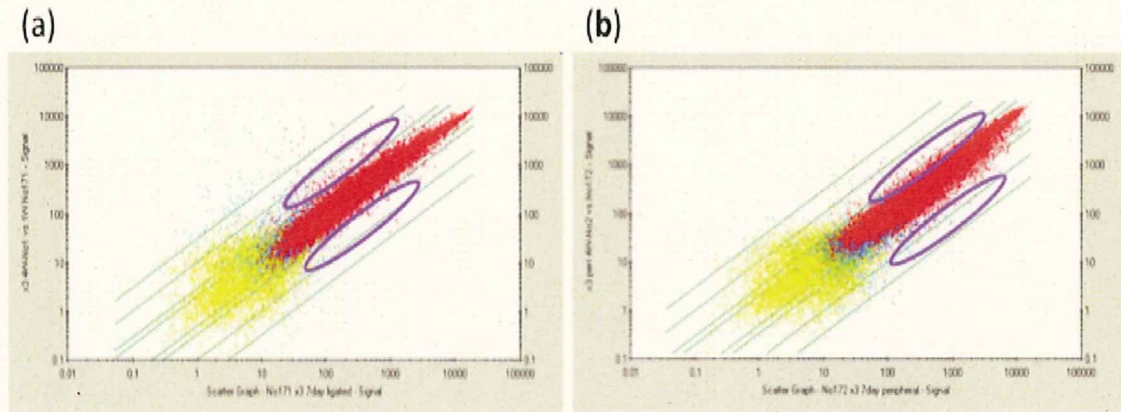


図1 細胞シート移植後の心臓組織の遺伝子発現の比較

(a) 心筋梗塞部で移植後1週と4週後で比較した結果 (b) 心筋梗塞周辺部で移植後1週と4週後で比較した結果

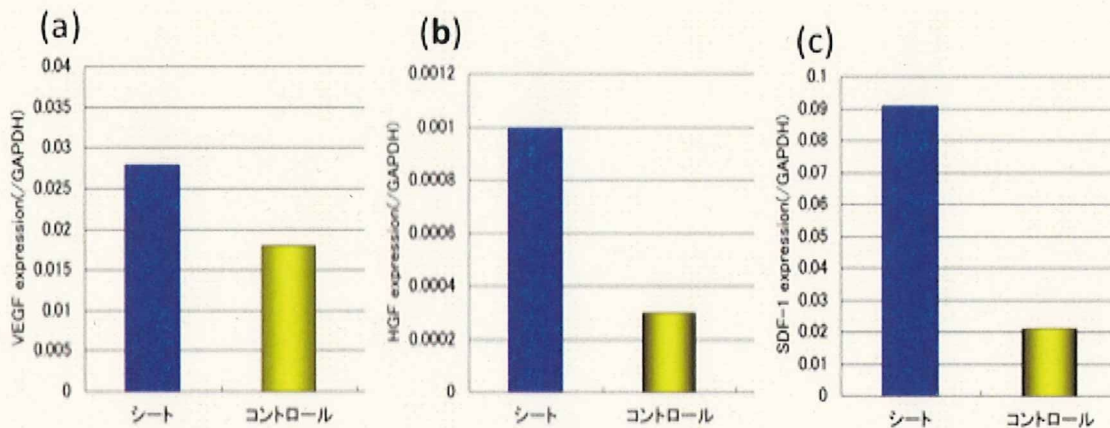


図2 候補因子の遺伝子発現解析

細胞シート移植後の組織の各種因子(a) VEGF (b) HGF (c) SDF-1 の発現を RT-PCR で解析した

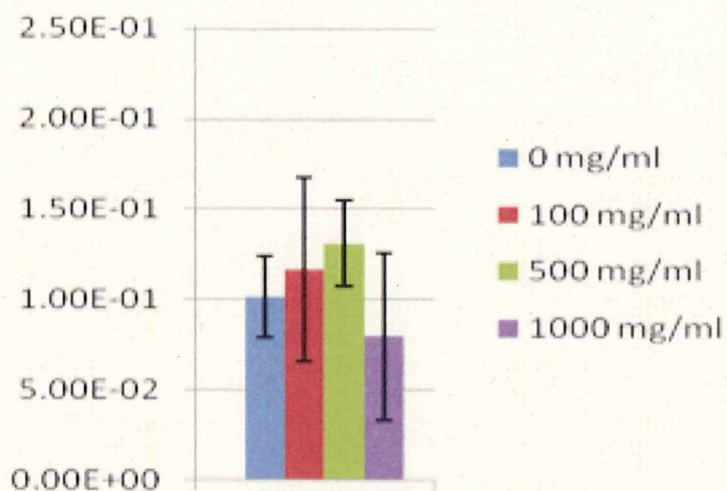


図3 培養心臓由来線維芽細胞への添加実験

ラット心臓由来線維芽細胞の培養上清に種々の濃度で因子を添加し、エラスチンの発現を解析した。

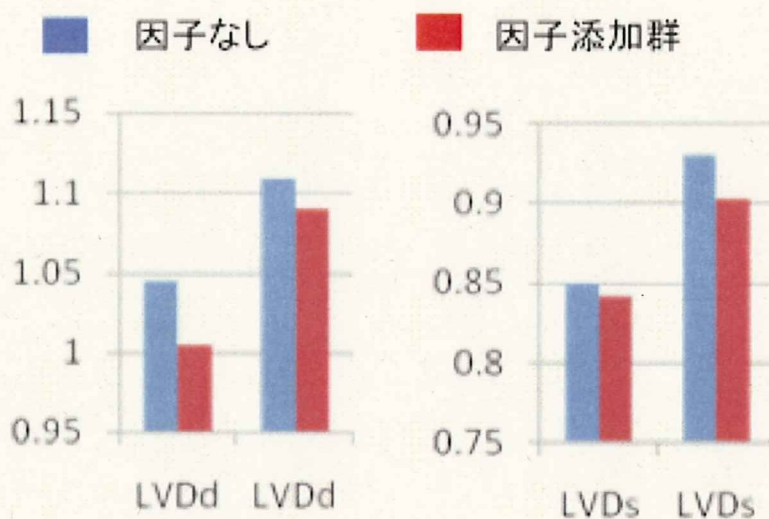


図4 エラスチン産生促進因子のラット心筋梗塞モデルへの移植実験

エラスチン産生促進因子をコラーゲンスポンジに含浸させ、ラット心筋梗塞モデルの梗塞部位に移植し、4週後心臓超音波で解析した。

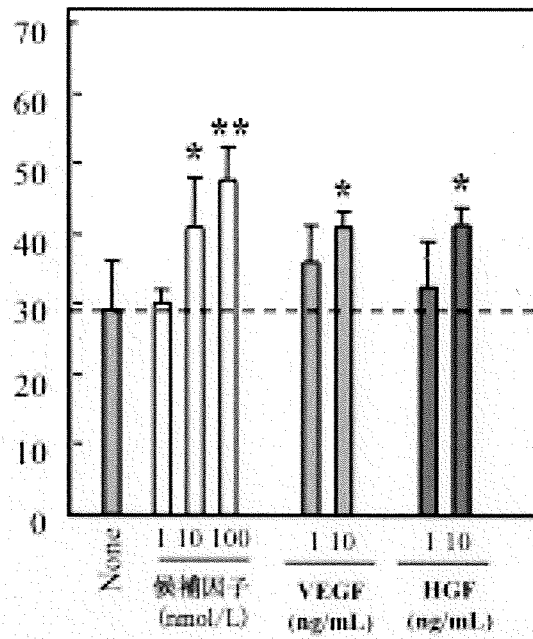


図5 心筋再生誘導低分子化合物の血管誘導促進効果の検討

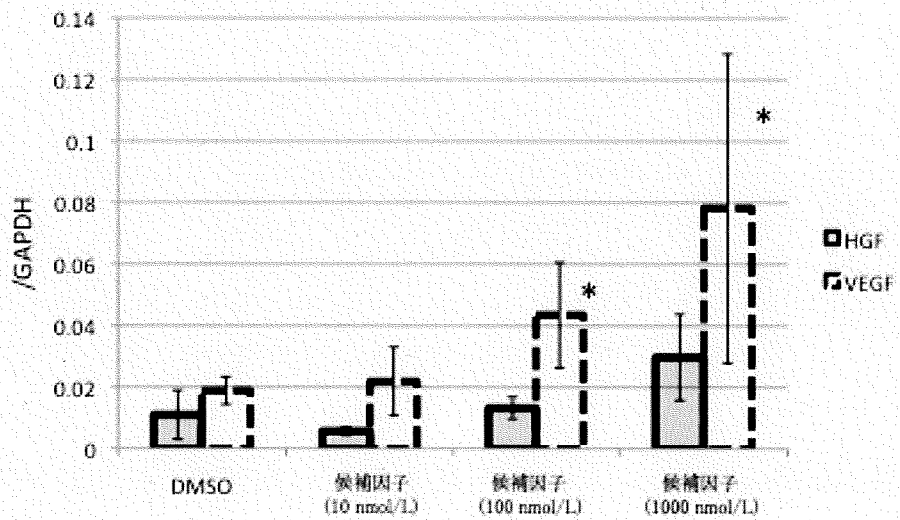


図6 心筋再生誘導低分子化合物の遺伝子発現

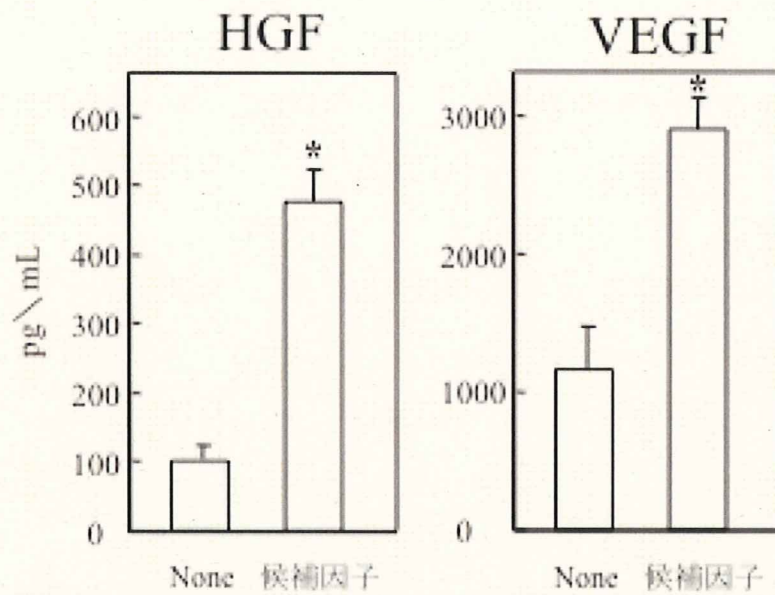


図7 心筋再生誘導低分子化合物の HGF、VEGF の産生促進効果

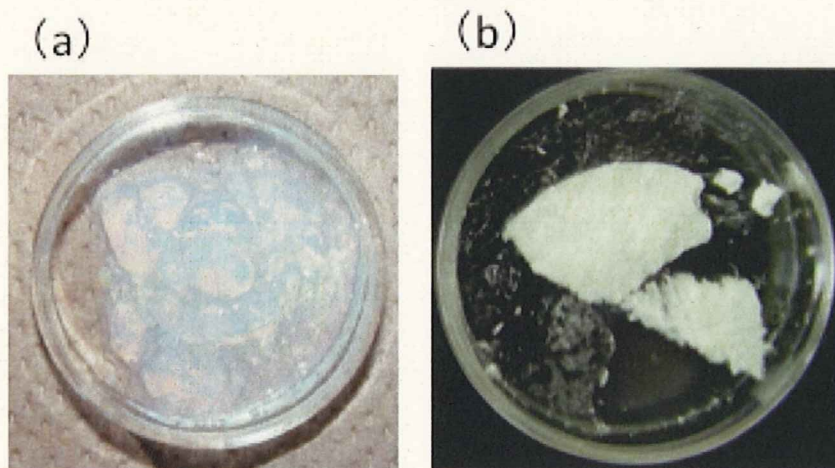


図8 架橋アルブミンの作製

(a) 5%アルブミン溶液に架橋剤を加え、ゲル状の架橋アルブミンを作製できる (b) ゲル状の架橋アルブミンを凍結することでスポンジ状の架橋アルブミンを得ることができる

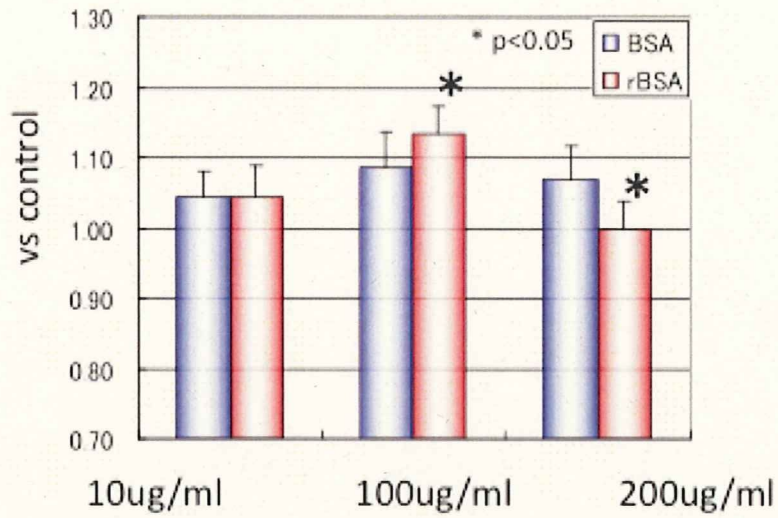


図9 ヒト臍帯血由来内皮細胞(HUVEC) 増殖試験

HUVEC の培養上清に培養上清に種々の濃度で因子を添加し、細胞の増殖を検討した

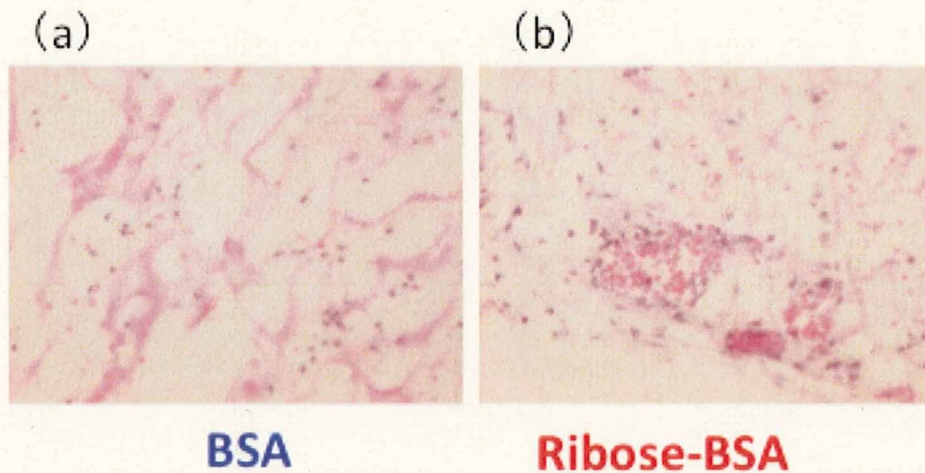


図10 ラット皮下埋植試験 (6日間 HE 染色)

スポンジ状の架橋アルブミン(a)とリボースにより糖化させたスポンジ状の架橋アルブミン(b)をラット背部皮下に移植し6日後の組織像。リボースにより糖化させたスポンジ状の架橋アルブミン(b)を移植した群で、ゲル内への新生血管の侵入が観察された。

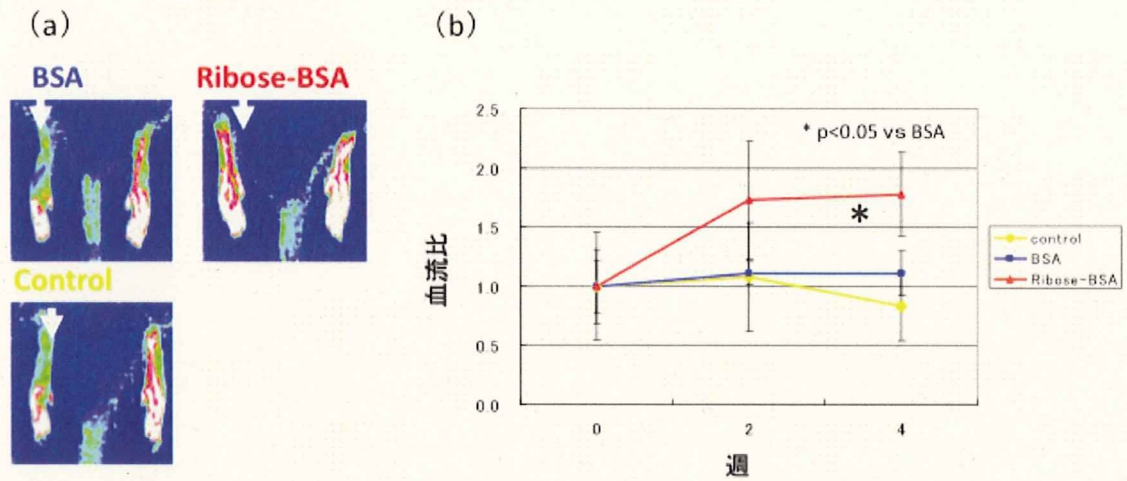


図 1 1 ラット下肢虚血モデルに対する血流回復効果

(a)レーザードップラーイメージよりリボース化架橋アルブミン移植群で血流の回復が観察された (b) 正常肢との比較

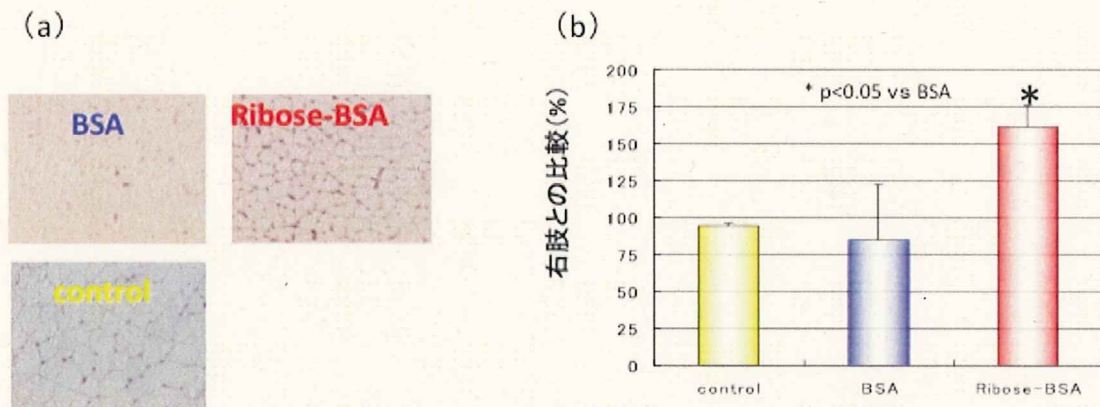


図 1 2 ラット下肢虚血モデルに対する血管新生誘導効果

(a) 移植組織のアルカリフォスファターゼ染色 (b) 染色像から新生血管数の画像解析結果